6 Diskussion

6.1 Leistungsfähigkeit der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP

Die Grundlage der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP war der Einsatz von nicht humanen Oligonukleotiden und die Detektion der resultierenden fluoreszenzmarkierten Produkte durch eine Hochdurchsatzkapillar-SSCP. Durch die systematische Suche nach Oligonukleotiden, die nicht im humanen Genom vorkommen, wurden die experimentellen Rahmenbedingungen optimal für die anschließenden Mutations- und Polymorphismusuntersuchungen eingestellt. In Hinsicht auf eine Nicht-Amplifizierung genomischer DNA zeigte die Sequenz 5'- GTG ACG TAC TAG CAA CG für den Einsatz als universeller Vorwärtsprimer und die Sequenz 5'- TAG CAG GAT ACG ACT ATC für den Einsatz als universeller Rückwärtsprimer die besten Ergebnisse. Diese nicht humanen Sequenzen wurden an die jeweiligen 5'-Enden aller spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gesetzt. Nach einer Amplifikation lagen die PCR-Produkte mit den verlängerten nicht humanen Sequenzen als „template" für eine anschließende PCR vor. In einer zweiten Reaktion wurden zum „template" zwei unterschiedliche universelle Oligonukleotide gegeben, die komplementär zu den verlängerten Enden der Vorwärts- und Rückwärtsprimer waren und zusätzlich unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen aufwiesen. Hierdurch konnte eine effiziente und kostengünstige Fluoreszenzmarkierung erreicht werden. Die universelle Fluoreszenzmarkierung wurde im LDL-Rezeptor-Gen für Mutationsuntersuchungen und in den ursprünglichen Long-QT-Genen für Polymorphismusuntersuchungen angewandt.

Während Mutationen, bis auf wenige Ausnahmen nur einmal in einem zu untersuchenden Gen vorkommen, ist die Anzahl von Polymorphismen pro Gen relativ hoch. Unter diesem Gesichtspunkt wurde eine Ein-Schritt-PCR für den Nachweis von Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen etabliert. Hierfür wurden alle vier Oligonukleotide in eine Reaktion zusammengegeben, in dem die spezifische und die universelle PCR hintereinander als Kaskade lief. Sowohl in der Ein-Schritt-PCR als auch in der Zwei-Schritt-PCR zeigten die universellen Primer eine hohe Spezifität. In allen PCR-Amplifikationen konnten durch den spezifischen Anteil der Primer spezifische und durch den universellen Anteil der Primer

gezielte Fluoreszenzmarkierungen erreicht werden. Die durch die universellen nicht-humanen Sequenzen fluoreszenzmarkierten DNA-Abschnitte wurden in einer Hochdurchsatz-Kapillar-SSCP nach der Konformation getrennt. Bei dem mit 16 Kapillaren arbeitenden 3100 Genetic Analyzer mussten dafür die Bedingungen für eine schnelle und effektive Detektion entwickelt und etabliert werden. Durch verschiedene Polymer- und Temperaturprofile konnte ein optimales Mobilitäts- und Konformationsverhalten eingestellt werden. So ist das beste Auflösungsverhalten zwischen zwei fluoreszenzmarkierten Fragmenten bei einer Temperatur von 35 °C und einem Polymer mit einem Anteil von 5 % an GeneScan sowie 10 % Glycerin ermittelt worden. Das Mobilitätsverhalten wurde mit einer 36 cm und einer 50 cm langen 16-Kapillarnadel untersucht. Die längere Kapillare zeigte geringfügig schlechtere Ergebnisse bei längeren Trennzeiten der Fragmente. Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden daher mit der 36 cm Kapillare durchgeführt.

Für die Auswertung von genomischen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen wurde immer eine Wildtyp-DNA-Probe mit den zu untersuchenden Mutationskontrollen exonweise amplifiziert und die Fluoreszenzsignale vergleichend ausgewertet. Die in dieser Arbeit durchgeführte universelle Ein-Schritt-Markierung mit einer anschließenden Kapillar-SSCP-Separation ist in dieser Form in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Vergleicht man die entwickelte Applikation mit klassisch doppeltmarkierten PCR-Produkten, die ebenfalls durch eine SSCP separiert wurden, so liefert die hier dargestellte Methode gleichwertige und teilweise höhere Sensitivität bei gleichzeitig niedrigeren Kosten und höherem Probendurchsatz (Geisel *et al.* 1999; Kozlowski *et al.* 2001).

Für das Auffinden von Polymorphismen in den Long-QT-Genen sind die Fluoreszenzsignale aller eingesetzten DNA-Proben für jede untersuchte Kohorte verglichen worden. Diese visuell-optische Auswertung kann jedoch Fehlinterpretationen Vorschub leisten. Besonders bei hohem Durchsatz verringert sich die Zeit pro Auswertung einer Probe, was zu Fehlinterpretationen der Fluoreszenzmuster führen kann. Abhilfe könnte jedoch das Einsetzen von Auswertungssoftware schaffen, indem die Fluoreszenz-Rohdaten der zu untersuchenden Proben automatisch verglichen und etwaige Unterschiede gezeigt werden.

Die universelle multifluoreszenzunterstützte Kapillar-SSCP trägt auch zur Kostenreduktion bei, da nicht jedes DNA-Fragment mit spezifischen Farbstoffen während einer PCR markiert werden muss. Durch den Einsatz von Fluoreszenzmarkierungen anstelle von z. B. Radioaktivität ist sie sehr umwelt- und gesundheitsfreundlich. Zudem sind die

Reaktionen lange lagerfähig, ohne die Fluoreszenzintensivität zu verlieren. Die durch den universellen Anteil der Primer doppeltmarkierten PCR-Produkte konnten in einer 16-Kapillar-SSCP auf das Vorhandensein von Veränderungen auf DNA-Ebene untersucht werden. Diese vollständige und uniforme Untersuchung eines Gens auf Mutationen bzw. Polymorphismen in der DNA hat einen Vorteil gegenüber speziellen Nachweisverfahren. Während bei speziellen Nachweisverfahren wie z. B. dem 5'-Nuklease-Assay oder einem Restriktions-Assay gezielt einzelne Mutationen nachgewiesen werden, wird hier der gesamte amplifizierende Bereich auf Veränderungen untersucht. Daher ist der Einsatz der entwickelten und etablierten Applikation besonders für größere Projekte interessant. Unter diesem Gesichtspunkt scheint auch die oben erwähnte Ein-Schritt-PCR sehr attraktiv zu sein. Alle Amplifikationen im LDL-Rezeptor-Gen wurden mit einer Ein-Schritt-PCR durchgeführt. Die zu amplifizierenden Abschnitte wiesen verschiedene Längen mit unterschiedlichen GC-Mengen auf. Dies zeigt, dass die Methode auch für Untersuchungen bei anderen Genen angewandt werden kann, weil die Verhältnisse der spezifischen und der universellen Primerpaare zu einander etabliert worden sind (vergleiche Kapitel 6.2). Eine Anwendung der Applikation könnte auch auf RNA Basis durchgeführt werden, indem vorher durch reverse Transkription eine cDNA-Kopie hergestellt und diese als „Target" für eine Ein-Schritt- oder Zwei-Schritt-PCR eingesetzt wird.

Es wurde versucht, die SSCP als Hochdurchsatzverfahren zu etablieren. Durch den Einsatz der 16 parallel arbeitenden Kapillaren konnte eine schnelle Konformationsanalyse der universellen fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte realisiert werden. Eine Erhöhung des Probendurchsatzes kann unter anderem durch den Einsatz einer 48 oder sogar einer 96 parallel arbeitenden Kapillare erreicht werden. Jedoch müssten die Polymerbedingungen überprüft und evtl. neu entwickelt werden. Alternativ ist es auch möglich, weitere universelle nicht humane Sequenzen durch den Einsatz von Datenbanken zu entwickeln, um die Multiplexfähigkeit zu steigern. Die unterschiedlichen universellen Sequenzen können mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert werden. Da die etablierte Applikation auf PCR beruht, besteht die Möglichkeit einer Automatisierung. Durch roboterunterstützte Automatisierungen können bei einer höheren Präzision zufällige Fehler vermieden und homogenere Signalbilder für Datenauswertungen erreicht werden. Außerdem bieten sie die Möglichkeit, das Reaktionsvolumen bei gleichzeitigem hohen Probendurchsatz zu verkleinern.

6.2 Analyse von Mutationen für die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie

Die molekulare Diagnostik der Familiären Hypercholesterinämie durch den Einsatz der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP ermöglicht es, Risikopersonen für die koronare Herzkrankheit zu identifizieren. In der vorliegenden Untersuchung wurden 30 verschiedene Mutationen auf ihre Detektionsfähigkeit durch die neu entwickelte universelle Multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP untersucht. Um die Mutationsvielfalt abzudecken, die in der Familiären Hypercholesterinämie im LDL-Rezeptor-Gen vorhanden ist, wurden Mutationen von verschiedenen Arbeitsgruppen gesammelt. Es konnten Mutationen eingesetzt werden, die einen Basenaustausch, eine kleine Deletion oder eine Insertion aufwiesen. Alle eingesetzten Mutationen verteilten sich in 15 Exons des LDL-Rezeptor-Gens. Für den Promotor, Exon 1, Exon 13, Exon 16 und Exon 18 standen leider keine Mutationskontrollen zur Verfügung. Von den eingesetzten 30 Mutationen konnten 28 identifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 93 %. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, in denen ebenfalls die SSCP für die Detektion von Mutationen herangezogen wurde, konnte eine Sensitivität von 80 bis 95 % erreicht werden (Ravnik-Glavac *et al.* 1994; Kozlowski *et al.* 2001).

Obwohl versucht wurde, die fluoreszenzmarkierten Ein-Schritt-PCR-Produkte für die Kapillar-SSCP-Detektion von Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen so klein wie möglich zu halten, waren die durchschnittlichen Amplifikate ca. 300 bp lang. Das längste Fragment war 404 bp lang. Eine Abhängigkeit der zunehmenden Länge eines PCR-Produkts mit der abnehmenden Wahrscheinlichkeit einer Mutationsdetektion während einer SSCP konnte nicht beobachtet werden. Andere Autoren geben eine optimale Länge der DNA-Fragmente von unter 150 bp an, dabei soll auch die Sensitivität am höchsten sein (Sheffield *et al.* 1993; Geisel *et al.* 1999). Der GC-Gehalt der Amplikons schwankte zwischen 50,9 % (Exon 13) und 64,5 % (Exon 8). Die eingesetzte DNA-Mutationskontrolle C337S mit einem GC-Gehalt von 64,5 % in Exon 8 konnte eindeutig identifiziert werden. Einen Zusammenhang zwischen GC- Gehalt eines fluoreszenzmarkierten PCR-Produktes und einer SSCP Detektion konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

Lediglich die beiden DNA-Mutationskontrollen S285L (Exon 6) und S589C (Exon 12) konnten nicht identifiziert werden. Die Ursachen liegen nicht in der Amplikonlänge und

im GC-Gehalt. Zum einen konnte eine weitere DNA-Mutationskontrolle in Exon 6 (E256L) und zum anderen konnten alle anderen DNA-Mutationskontrollen mit verschiedenen PCR-Produktlängen und verschiedenen GC-Mengen durch die SSCP-Auswertung ermittelt werden. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Konformation der beiden Mutationen. Das Prinzip der SSCP beruht darauf, dass die Einzelstränge eines PCR-Produktes eine bestimmte Konformation bzw. Sekundärstruktur einnehmen (Orita *et al.* 1989). Ist eine Mutation vorhanden, ändert sich die Konformation und damit die Mobilität in einem nicht denaturierendem Elektrophoreselauf. Es ist möglich, dass die durch die Mutation hervorgerufene Konformationsänderung in keinem der beiden Einzelstränge des PCR-Produktes sichtbar ist, weil das Fluoreszenzmuster sich genauso verhält wie die der Wildtyp-DNA-Probe, obwohl jeder Einzelstrang eine andere Farbstoffmarkierung besitzt. Dieses Konformationsverhalten konnte auch in der Analyse der anderen erkannten DNA-Mutationskontrollen beobachtet werden. Bei den meisten wurde ein abweichendes Fluoreszenzmuster zur Wildtyp-DNA-Probe von einem Einzelstrang erkannt, obwohl beide Einzelstränge mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert worden waren. In der Literatur wird dies mit dem Auftreten von zwei verschiedenen möglichen Konformationenszuständen eines Stranges erklärt (Orita *et al.* 1989; Ghozzi *et al.* 1999). Zum einen kann ein Muster die lineare Form der einzelsträngigen DNA widerspiegeln, während der andere für die sekundäre Struktur steht (Katsuragi *et al.* 1996). Außerdem kann es zwei verschiedene stabile Stadien der Sekundärstruktur geben. Die Untersuchungen haben auch gezeigt, dass jede Mutation ein eigenes Muster hat. Dies wird deutlich, wenn die beiden Mutationen D245E und D245Y im Exon 6 betrachtet werden. Obwohl die Mutationsposition um eine Base zwischen diesen beiden Mutationen verschoben ist, ist das Fluoreszenzmuster zur Wildtyp-DNA-Probe völlig anders. Bei einer unbekannten zu untersuchenden DNA-Probe kann somit vom spezifischen Fluoreszenzmuster auf die Mutation zurückgeschlossen werden. Ergeben sich in der Anwendung der entwickelten universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP Untersuchung Hinweise auf eine Mutation, sollten die jeweiligen Exons trotzdem sequenziert werden. Dies ist notwendig, weil die Vielzahl der bekannten Mutationen, bisher sind mehr als 700 Mutationen beschrieben (Villeger *et al.* 2002), sowie die große Wahrscheinlichkeit der Existenz weiterer bisher unbekannter Mutationen gleiche Fluoreszenzmuster aufweisen können.

Für die Untersuchungen der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP als Diagnostikverfahren für die Familiäre Hypercholesterinämie sind die entwickelten universellen Oligonukleotide an die jeweiligen 5'-Enden der spezifischen Primer des LDL-Rezeptors gekoppelt worden. Die entwickelten und etablierten zwei unterschiedlichen nicht humanen universellen Oligonukleotide zeigten während der Ein-Schritt-PCR keine falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnisse. Alle Amplifikationen, bei denen die universellen Oligonukleotide beteiligt waren, zeigten hohe Spezifität. Die universellen Oligonukleotide dienten bei dieser Untersuchung als Farbstoffmarkierung. Für eine Doppelfluoreszenzmarkierung eines PCR-Produktes sind verschiedene Fluoreszenz-Moleküle wie FAM, NED, HEX, VIC und PET als Kombination getestet worden, um das oben aufgeführte Konformationsverhalten von Einzelsträngen zu untersuchen und gegebenenfalls zu kompensieren. Die Farbstoffe FAM und VIC wurden für das Markieren des Vorwärtsstranges verwendet, während NED, PET und HEX für den Rückwärtsstrang eingesetzt wurde. Die in Kombination eingesetzten Farbstoffe zeigten in ihren Fluoreszenzmustern keine Unterschiede. Bei unterschiedlichen Farbstoffkombinationen waren die Muster der Fluoreszenzfarben gleich bzw. ähnlich. Dies unterbindet leider die Multiplexfähigket dieser Applikation, in denen zwei verschiedene separate Ein-Schritt-PCR-Produkte des gleichen Amplikons für einen Kapillar-SSCP-Lauf vereinigt werden. Es ist aber durchaus möglich, zwei verschiedene Amplikons von verschiedenen DNA-Proben zu vereinigen. Dies wurde in der Arbeit nicht untersucht. Für weitere Folgeuntersuchungen könnte auch versucht werden, weitere universelle nicht-humane Sequenzen zu finden, um eine Multiplexreaktion und damit auch eine Kapazitätserhöhung zu erreichen.

Das Verhältnis zwischen den verlängerten spezifischen und den kurzen universellen fluoreszenzmarkierten Primerpaaren war 33 nM zu 166 nM. Bei diesen Oligonukleotidverhältnissen war die Ausbeute und das Diskriminierungsverhalten aller eingesetzten DNA-Proben zwischen einer Wildtyp- und einer Mutationsprobe am größten. Für die Auswertung von genomischen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen wurde immer eine Wildtyp-DNA-Probe mit den zu untersuchenden Mutationskontrollen exonweise amplifiziert und vergleichend ausgewertet.

Das Krankheitsbild der Familiären Hypercholesterinämie wird neben dem LDL-Rezeptor auch vom Apolipoprotein-B-Gen hervorgerufen. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor-Gen standen für das Apolipoprotein-B-Gen keine Kontrollmutationen zur Verfügung. Das

Apolipoprotein-B befindet sich an der Oberfläche der LDL-Partikel, die an den LDL-Rezeptor binden. Hier ist zu erwähnen, dass die Mutation Arg3500Gln eine hohe Prävalenz besitzt und einen Austausch von Arginin zu Glutamin an der Aminosäureposition 3500 bewirkt. Leider stand für diese Mutation keine ausreichende DNA-Menge zur Verfügung.

Die meisten der bisher entdeckten Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen treten in den Exons 3 und 4 auf, alle anderen sind weitgehend gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt (Auswertung der Datenbank: LDLR Mutationen). Die eingesetzten Mutationskontrollen sind ähnlich verteilt und spiegeln somit diese Hot-Spot-Regionen wider, die alle durch die universelle multifluoreszentunterstützte Kapillar-SSCP erkannt wurden. Die entwickelte universelle Ein-Schritt-Markierung mit einer anschließenden multifluoreszenzunterstützten Kapillar-SSCP-Seperation kann daher für die Diagnose der Familiären Hypercholesterinämie eingesetzt werden. 90 % der Mutationen im LDL-Rezeptor stellen Punktmutationen, kleine Insertionen und Deletionen dar. Größere Insertionen und Deletionen, die eine Größe von bis zu einigen hundert Basen haben können, sind jedoch mit der Applikation nicht durchführbar und erfassbar. Die Applikation hat sich als zuverlässige Methode zum Auffinden von Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen bewährt. Die Methode kann alleine zur Untersuchung von Patienten-DNA herangezogen oder in Kombination mit bereits speziellen entwickelten Routinetests als Ergänzung eingesetzt werden. Außerdem können entdeckte Mutationen in bereits existierende Tests einbezogen und integriert werden. Da die Bedingungen für das Auffinden von Mutationen etabliert worden sind, kann die Applikation auch für die Diagnostik von anderen Krankheiten eingesetzt werden.

Es soll aber auch auf folgendes hingewiesen werden. In dieser Arbeit wurden DNA-Proben mit bekannten Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen untersucht. Damit entfiel die Patientenauswahl. Es ist bekannt, dass die klinische Erscheinungsform der Familiären Hypercholesterinämie zum einen von der Art der Mutation im LDL-Rezeptor-Gen und zum anderen von Umweltbedingungen und weiteren genetischen Faktoren beeinflusst wird (Ferrieres *et al.* 1995; Goldstein *et al.* 1995). So ist es durchaus möglich, dass bei Vorliegen eines phänotypischen FH-Bildes eines Indexpatienten, ein anderer genetischer Defekt als der des LDL-Rezeptor-Gens vorliegt. Das Krankheitsbild kann, wie oben beschrieben, durch eine Mutation im Apolipoprotein-B hervorgerufen werden, was für einen Familiären Apolipoprotein B Defekt spricht (abgekürzt FDB für engl. Familial Defective Apolipoprotein B) (Rauh *et al.* 1992). Außerdem sind auch zwei Loci auf Chromosom 1 (Garcia *et al.* 2001)

und Chromosomen 15 (Ciccarese *et al.* 2000) mit einem autosomal rezessiven Erbgang beschrieben worden, deren Veränderung einen Phänotyp der Familiären Hypercholesterinämie hervorrufen kann. Für Chromosom 1 wurde gezeigt, dass Mutationen im ARH-Gen (Autosomal Ressezive Hypercholesterinämie Gen, ARH), welches eine Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (PTB) kodiert, hierfür verantwortlich ist (Garcia *et al.* 2001; Al-Kateb *et al.* 2002; Al-Kateb *et al.* 2003). Es wurden auch Fälle beschrieben, in denen Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen vorlagen, jedoch die untersuchten Personen kein phänotypisches FH-Bild zeigten (Knoblauch *et al.* 2000). Hier konnte auf die Existenz eines cholesterinsenkenden Gens als „Modifikator“ (modifier) auf Chromosom 13 hingewiesen werden.

6.3 Genetische Variationen in den Long-QT-Syndrom-Genen und deren Analyse

Durch den Einsatz der universellen Multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP konnte eine große Anzahl von SNPs eindeutig detektiert und anschließend identifiziert werden. Um SNPs in den Long-QT-Genen zu finden, wurden 30 DNA-Proben eines gesunden Kontrollkollektivs kaukasischen Ursprungs mit einer fluoreszenzmarkierten Zwei-Schritt-PCR amplifiziert und untersucht. Zum Auffinden von Polymorphismen wurden die Chromatogramme des eingesetzten Kontrollkollektivs herangezogen und die Fluoreszenzmuster der DNA-Proben untereinander verglichen. Jede Veränderung des Fluoreszenzmusters wurde durch eine Sequenzierung verifiziert, da Polymorphismen im Gegensatz zu Mutationen gehäuft in Genen vorkommen. Jeder in diesen 30 DNA-Proben entdeckte SNP, wurde auch in einem Zwillingskollektiv von 188 DNA-Proben unabhängig von der Frequenz untersucht. Durch die Vorselektion an einem Kontrollkollektiv war es nicht nötig, die gesamten Bereiche aller Long-QT-Gene im Zwillingskollektiv auf das Vorhandensein von SNPs zu durchsuchen, was den Aufwand erheblich reduzierte. Das Zwillingskollektiv bestand aus 47 dizygoten Zwillingspaaren und 94 Einzelpersonen monozygoter Zwillinge. Da sowohl das Kontrollkollektiv als auch die genotypisierten Zwillinge kaukasischen Ursprungs waren, konnten ähnliche Allelfrequenzen beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Probenanzahl des Kontrollkollektivs auf 50 oder auf 100 keine nennenswerten Vorteile zum Auffinden von Polymorphismen erbringen würde. Jedoch steigt die

Wahrscheinlichkeit, niedrigfrequente SNPs zu finden, mit einer Erhöhung der Probenzahl. Die vergleichende Auswertung der Fluoreszenzmuster, der Zwei-Schritt-PCR-Produkte, hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen. Einerseits konnten schnell SNPs gefunden, andererseits die aus der spezifischen Amplifikation stammenden unmarkierten PCR-Produkte durch den Einsatz unmarkierter universeller Primer direkt sequenziert werden, um einen Polymorphismus zu verifizieren und zu bestätigen. Dies ist besonders bei größeren Projekten wichtig, weil man hierdurch zu einer Kosten- und Zeitersparnis beiträgt. Eine reproduzierbare Genotypisierung über jeweilige Fluoreszenzmuster konnte ebenfalls festgestellt werden. So waren die Muster für einen SNP in fast allen Fällen gleich bzw. ähnlich. Die Leistungsfähigkeit war hingegen begrenzt, wenn zwei Gruppen, in diesem Fall Proben des Kontrollkollektivs und Proben des Zwillingskollektivs, über Fluoreszenzmuster verglichen und genotypisiert wurden. Das spezifische SSCP-Fluoreszenzmuster für einen SNP des Kontrollkollektivs stimmte nicht immer mit dem der Zwillingsproben überein. Nähere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Polymorphismus vorhanden, aber der Genotyp unterschiedlich war, oder in wenigen Fällen ein weiterer Polymorphismus in der untersuchten Region vorhanden war. Die entwickelte universelle multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP eignet sich daher nicht als reine Genotypisierungsapplikation. Zum Screenen und Durchsuchen von Genen auf das Vorhandensein von Polymorphismen hat sich die Applikations als sehr zuverlässig erwiesen.

Wie in Kapitel 6.2 dargestellt, beträgt die Sensitivität 93 %. So konnten in den ursächlichen Long-QT-Genen insgesamt 35 SNPs in den Kontroll- und Zwillingskohorten identifiziert werden. Es wurden alle kodierenden und nichttranslatierten Regionen auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht. Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass theoretisch 2 bis 3 SNPs nicht erfasst werden konnten, da die Sensitivität der Applikation 93 % beträgt.

Insgesamt wurden 27091 bp auf das Vorhandensein von SNPs untersucht. Wird die Anzahl der gefundenen SNPs berücksichtigt, so ergibt dies einen Durchschnittswert von einem Polymorphismus pro 775 Basenpaare humaner genomischer DNA. Dies entspricht einer Häufigkeit, die mit verschiedenen Veröffentlichungen übereinstimmt (Kwok *et al.* 1996; Taillon-Miller *et al.* 1998).

Nach der Durchsuchung sowie der Verifizierung und der Identifizierung von Polymorphismen in beiden Kohorten wurden die anschließenden Genotypisierungen der

Zwillingsproben mit einer Primer-Extension-Reaktion durchgeführt. Dies schien notwendig und sinnvoll zu sein, um nicht definierbare oder auch unkorrekt interpretierte Fluoreszenzmuster für weitere Analysen heranzuziehen und somit falschen Genotypen vorzubeugen. Um eine größere Sicherheit zu erhalten, wurden die durch die universelle multifluoreszenzunterstützte PCR-SSCP erhaltenen Fluoreszenzmuster mit den entsprechenden Genotypen der Primer-Extension-Reaktion verglichen. Diese waren in den meisten Fällen identisch. Kleinere Unregelmäßigkeiten wurden durch Sequenzierung geklärt. Insgesamt konnten 6580 Genotypisierungen mit der Primer-Extension-Reaktion bei einem Zwillingskollektiv bestehend aus 48 dizygoten Zwillingspaaren und 94 Einzelpersonen monozygoter Zwillinge durchgeführt werden.

Von den untersuchten SNPs konnten 10 auf KCNE1, 4 auf KCNE2, 8 auf KCNQ1, 6 auf HERG und 7 auf SCN5A lokalisiert werden. Die untersuchten Gene wurden exonübergreifend auf SNPs durchsucht. Betrachtet man die Länge der untersuchten Sequenzen für jedes Gen separat und berücksichtigt die Anzahl der gefundenen SNPs, so kann festgestellt werden, dass die SNP-Häufigkeit abhängig von der Größe der LQT-Gene ist. Je kleiner das Gen ist, desto mehr Polymorphismen kommen vor. So ist statistisch gesehen ein SNP alle 282 Baasen bei KCNE1, ein SNP alle 330 Basen bei KCNE2, ein SNP alle 660 Basen bei KCNQ1, ein SNP alle 1052 Basen bei HERG und ein SNP alle 1600 Basen bei SCN5A vorhanden. Hotspotbereiche sind hier nicht berücksichtigt. Auffallend ist, dass Mutationsuntersuchungen bei Patienten mit einem Long-QT-Syndrom andere Häufigkeiten in den Genen zeigen. Bei einer umfangreichen Untersuchung wurden die wenigsten Mutationen bei KCNE1 und KCNE2 und die meisten bei KCNQ1 und HERG entdeckt (Splawski *et al.* 2000). Die Anzahl der entdeckten Mutationen im SCN5A Gen lag höher als bei KCNE1 und KCNE2 aber deutlich geringer als bei KCNQ1 und HERG. Es scheint daher, dass gerade die regulatorischen ß-Untereinheiten, die von den beiden Genen KCNE1 und KCNE2 kodiert werden, keine großen Veränderungen in Form von Mutationen zulassen, da sie mit dem Leben unvereinbar sein könnten. Auch unter dem Gesichtspunkt, dass Mutationen in KCNE1 und KCNE2 mildere kardiale LQT Phänotypen in Form von kürzeren QTc-Intervallen zeigen. Hingegen könnte die große Anzahl der gefundenen Polymorphismen auf eine kleine individuelle Beeinflussung des QTc-Intervalls hindeuten. Unter diesem Gesichtspunkt scheint es interessant zu sein, Mutationsträger in diesen beiden Genen auch auf das Vorhandensein von Polymorphismen zu untersuchen. So könnte in anschließenden Experimenten untersucht

werden, ob die Präsenz eines Polymorphismus bei gleichzeitigem Vorhandensein einer Mutation einen milderen LQT Phänotyp bewirkt oder diesen leicht beeinflusst. Viswanathan und Mitarbeiter konnten vor kurzem zeigen, dass die Mutation T512I im SCN5A Gen allein einen größeren Einfluss auf den Natriumkanal ausübt als zusammen mit dem Polymorphismus H558R (Viswanathan *et al.* 2003) bei einem Patienten mit einer Erregungsweiterleitungsstörung (Bradycardy). Dieser beschriebene Polymorphismus H558R ist auch in der eingesetzten Population gefunden worden (SCN5A, SNP Nr. 32). Die homozygote GG-Form zeigt eine um durchschnittlich 4,45 Millisekunden (mSek.) verlängerte QTc-Zeit zu der homozygoten AA-Form und eine um durchschnittlich 11,87 mSek. verlängerte QTc-Zeit zu der heterozygoten AG-Form des funktionellen SNPs. Allerdings ist im eingesetzten Kollektiv der p-Wert = 0,108, was aber durch eine Erhöhung der Probenzahl die Signifikanzgrenze von p = 0,05 überschreiten könnte.

Die höchste Variationsfrequenz lag bei 50 % für SNP Nr. 7 und 9 und die niedrigste bei 1 % für SNP Nr. 3, 4, 6, 17, 19 und 28. 13 von den entdeckten 35 SNPs lagen im kodierenden Bereich (Missense-Polymorphismen), von denen 6 für einen Aminosäure-austausch verantwortlich waren. Die restlichen 22 SNPs verteilten sich zum größten Teil auf Introns (insgesamt 17) sowie 5'- und 3'- untranslatierte Bereiche (insgesamt 1 und 4). Die meisten SNPs zeigten jeweils einen Purin zu Purin (18 von 35 SNPs) oder Pyrimidin zu Pyrimidin (7 von 35 SNPs) Austausch. Von diesen Transitionen zeigten alleine 11 SNPs einen Basenaustausch von G->A. 10 von 35 SNPs zeigten einen Purin zu Pyrimidin Austausch bzw. Pyrimidin zu Purin.

Die gefundenen genetischen Variationen sind auch mit öffentlichen und kommerziellen Datenbanken verglichen worden. Es hat sich gezeigt, dass 13 von 35 SNPs neu und damit unbekannt waren. Die restlichen 22 SNPs konnten in verschiedenen Datenbanken gefunden werden. Allerdings lagen bei einigen Polymorphismen Angaben zu Allelfrequenzen sowie Population nicht vor. Die Datenbankabfrage wurde mit der DNA-Sequenz aller primerflankierenden Amplikons durchgeführt. So konnten zusätzlich 41 SNPs gefunden werden, die in den zu untersuchenden Regionen lagen. Diese kamen aber nicht in den untersuchten Populationen vor. Durch den Einsatz der entwickelten universellen multifluoreszenzunterstützten PCR-SSCP wurden nur die Polymorphismen selektiert, die auch in der zu untersuchenden Population vorkamen.

Die gemessenen frequenzkorrigierten QT-Intervalle (QTc) im Zwillingskollektiv zeigen eine Normalverteilung. Der arithmetische QTc-Mittelwert beträgt 415,52 mSek.. Allerdings bestehen signifikante Unterschiede zwischen den mittleren QTc-Werten bei Männern und Frauen. Während bei den männlichen Probanden der mittlere QTc-Wert 402,91 mSek. betragen hat, ist bei den weiblichen Probanden im Schnitt der Wert 420,88 mSek. gemessen worden. Frauen haben demnach einen höheren QTc-Wert als Männer und neigen somit eher zum Long-QT-Syndrom. Dies wurde auch in anderen Studien, bei denen gesunde normale Personen untersucht wurden, gefunden (Mayuga *et al.* 2001; Lanfranchi *et al.* 2002). Aus den Phänotypdaten ist auch eine gleichzeitige Zunahme der QTc-Werte mit dem Alter zu beobachten. So zeigt die Regression, dass 70-jährige Personen etwa 10 mSek. höhere QTc-Werte aufweisen als 20-jährige Personen. Daher wurde der genetische Einfluss der SNPs auf die QTc-Werte anhand der Residuen untersucht, da die Abhängigkeit von Alter und Geschlecht somit wegfallen. Die Phänotypdaten des untersuchten Kollektivs stellen aufgrund der Normalverteilung sowie der Geschlechts- und Altersabhängigkeit des QTc-Intervalles, einen repräsentativen Querschnitt gesunder Probanden dar. Die Bedeutung der LQT-Syndrom-Gene für die QTc-Zeit wurde bei gesunden Probanden mittels Mikrosatelliten bereits nachgewiesen (Busjahn *et al.* 1999).

In einer Varianzanalyse aller genotypisierten Zwillinge haben 4 SNPs eine Assoziation zum QTc-Intervall mit einem p-Wert $< 0,05$ gezeigt. Die QTc-Mittelwerte der heterozygoten Genotypen von SNP-Nr.2 (G/A) und SNP-Nr.4 (G/A) (beide im KCNE1 Gen) sind um -22,02 (von -21,31 bis 0,71) bzw. -37,11 (von -36,71 bis 0,4) mSek. niedriger als über den jeweiligen homozygoten Genotypen (G/G). Jedoch ist die Anzahl der Personen in heterozygoter Form der SNPs mit $n = 6$ bzw. $n = 2$ recht gering. SNP-Nr. 35 (im SCN5A Gen) erniedrigt den QTc-Mittelwert ebenfalls in heterozygoter Erscheinung (G/A) um -10,02 (von -7,63 bis 2,39) mSek. gegenüber dem homozygoten (G/G) Zustand und sogar um -16,23 (von -13,84 bis 2,39) mSek. bei der selteneren homozygoten (A/A) Erscheinung. Die Anzahl der Personen ist im Vergleich zu den erstgenannten SNPs mit $n = 35$ für (G/A) deutlich höher und $n = 6$ für (A/A) ähnlich verteilt. SNP-Nr. 28 zeigt im Gegensatz zu den oben beschriebenen Polymorphismen eine Erhöhung des QTc-Mittelwerts in heterozygoter (A/G) Erscheinung um 27,05 (von -0,57 bis 26,48) mSek. gegenüber dem homozygoten (A/A) Zustand. Diese vier SNPs könnten daher den QTc-Intervall in einer Normalbevölkerung um ca. -7,8 bis -36,7 mSek. senken bzw. um ca. 26,4 mSek. erhöhen. Der kürzlich beschriebene

Polymorphismus K897T im HERG Gen zeigt in homozygoter CC-Form eine um durchschnittlich 10 mSek. verkürzte QTc-Zeit zu der homozygoter AA-Form (Bezzina *et al.* 2003). Dieser SNP (SNP-Nr. 16) wurde auch in der eingesetzten Population gefunden und analysiert. Die homozygote CC-Form zeigt eine um durchschnittlich -12,64 (von -10,57 bis 2,07) mSek. verkürzte QTc-Zeit zu der homozygoten AA-Form und eine um -9,18 (von -10,57 bis -1,39) mSek. verkürzte QTc-Zeit zu der heterozygoten AC-Form des funktionellen SNPs. Der funktionelle Polymorphismus hat höchstwahrscheinlich einen Effekt auf die K^+-Kanalfunktion und somit auf den klinischen Phänotyp (Paavonen *et al.* 2003). Allerdings ist im eingesetzten Kollektiv der p-Wert = 0,205 für diesen SNP, was aber durch eine Erhöhung der Probenzahl die Signifikanzgrenze von p = 0,05 überschreiten könnte.

Es zeigt sich, dass die Präsenz von SNPs, abhängig vom Genotyp, die QT-Zeit im EKG verändern und dadurch einen milderen Phänotyp bewirken können. So könnten diese SNPs bei Patienten mit Herzrhythmusstörungen genotypisiert werden, um individuelle Medikamente zu verabreichen. Um die Signifikanzgrenze von p = 0,05, insbesondere für die grenzwertigen SNPs, deutlich zu überschreiten, muss die Probenzahl für eine Varianzanalyse erhöht werden. Die Daten können genutzt werden, um für das QT-Intervall verantwortliche Haplotyp-Muster/Blöcke zu finden, die in der allgemeinen Population vorkommen. Die gefundenen bzw. abgeschätzten Haplotypen würden genutzt werden, um QT-Intervalle für die allgemeine Bevölkerung vorauszusagen. Dies könnte auch für Personen und Familien, die vom plötzlichen Herztod betroffen sind und nicht ein monogenes QT-Syndrom aufweisen, überprüft werden. Die Haplotypen könnten somit für das frühzeitige Erkennen eines langen QT-Intervalles genutzt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Detektion von Mutationen und Polymorphismen auf genomischer Ebene durch den Einsatz der entwickelten und etablierten Applikation möglich ist.